

RECEIVED	
10 FEB 2004	
WIPO	PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto  
is a true copy from the records of the Korean Intellectual  
Property Office.

**PRIORITY  
DOCUMENT**

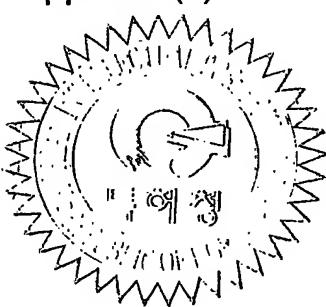
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

출 원 번 호 : 10-2003-0003765  
Application Number

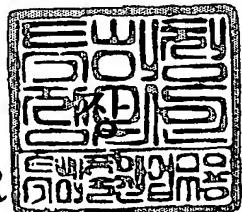
출 원 년 월 일 : 2003년 01월 20일  
Date of Application JAN 20, 2003

출 원 인 : 주식회사 뉴로테크 외 1명  
Applicant(s) NEUROTECH CO., LTD., et al.

2004 년 01 월 20 일



특 허 청  
COMMISSIONER



## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.01.20
【발명의 명칭】	뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사 억제 방법
【발명의 영문명칭】	Method for inhibition of necrosis induced by neurotrophin
【출원인】	
【명칭】	주식회사 뉴로테크
【출원인코드】	1-2000-013384-0
【대리인】	
【성명】	곽병주
【출원인코드】	4-1998-037755-0
【발명자】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2002-049335-3
【포괄위임등록번호】	2003-003718-1
【발명자】	
【성명】	곽병주
【출원인코드】	4-1998-037755-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	윤성화
【성명의 영문표기】	YOON, Sung Hwa
【주민등록번호】	550304-1820510
【우편번호】	442-810
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 957-6 삼익 아파트 321동 602호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김선희
【성명의 영문표기】	KIM, Sun Hee
【주민등록번호】	690322-2258235

【우편번호】	442-070
【주소】	경기도 수원시 팔달구 인계동 선경 1차 아파트 3동 1303호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	원석준
【성명의 영문표기】	WON, Seok Joon
【주민등록번호】	681127-1063419
【우편번호】	442-070
【주소】	경기도 수원시 팔달구 인계동 선경 1차 아파트 3동 1303호
【국적】	KR
【공지예외적용대상증명서류의 내용】	
【공개형태】	간행물 발표
【공개일자】	2002.07.20
【공지예외적용대상증명서류의 내용】	
【공개형태】	간행물 발표
【공개일자】	2002.12.09
【심사청구】	청구
【핵산영기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	8
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	35 면 35,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	11 항 461,000 원
【합계】	525,000 원
【감면 사유】	소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】	157,500 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 공지예외적용대상(신규성상실의여외, 출원시의특례)규정을 적용받 기 위한 증명서류_2통 3. 소기업을 증명하는 서류_1통

### 【요약서】

#### 【요약】

본 발명은 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사 억제 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 산화적 독성 억제제를 투여하여 세포괴사를 억제하는 방법 및 상기 산화적 독성 억제제와 뉴로트로핀을 함께 투여하여 세포괴사 및 세포고사를 동시에 억제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 산화적 독성 억제제는 뉴로트로핀에 의해 유도되는 신경세포의 괴사를 억제하고, 뉴로트로핀에 의한 신경세포의 고사 또는 예정사의 억제 효과에 영향을 주지 않기 때문에, 상기 산화적 독성 억제제를 뉴로트로핀과 함께 투여하면 뇌졸중, 외상성 뇌척추 손상에 의한 급성 뇌질환, 알츠하이머성 치매 및 파킨슨병등의 퇴행성 뇌질환에서 나타나는 뇌세포의 손상을 막고 재생을 촉진시킬 수 있다.

#### 【대표도】

도 17

### 【명세서】

#### 【발명의 명칭】

뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사 억제 방법{Method for inhibition of necrosis induced by neurotrophin}

#### 【도면의 간단한 설명】

도 1은 피질 신경세포 배양에서 신경인자를 지속적으로 처리하여 신경 세포 괴사를 초래한 것을 나타낸 그래프이다.

A : BDNF 처리,      B : NT-3 처리      및      C : NT-4/5처리.

도 2는 생리식염수 및 BDNF를 주입한 후 2일 후에 뇌를 절단하여 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하여 신경 세포 괴사를 확인한 것이다.

A : 생리식염수 주입 후 H&E로 염색한 사진,

B : BDNF 주입 후 H&E로 염색한 사진 및

C : 생리식염수 및 BDNF 주입 후 H&E로 염색한 사진으로부터 분석한 그래프.

도 3은 피질 신경세포를 동시에 세척 및 BDNF를 처리한 뒤 32시간이 지나 현미경을 통해 본 사진이다.

A : 동시에 세척하고 위상차현미경으로 본 사진,

B : BDNF 처리하고 위상차현미경으로 본 사진,

C : 동시에 세척하고 전자현미경으로 본 사진 및

D : BDNF 처리하고 전자현미경으로 본 사진.

도 4는 피질 신경세포에 BDNF를 32시간 동안 지속적으로 처리한 뒤 대조군과 BDNF를 처리한 군을 정상, 세포파사 및 세포고사의 군으로 분류하여 BDNF에 의해 유도되는 신경세포의 사멸의 형태를 분석한 그래프이다.

도 5는 피질 신경세포에 BDNF, 항-BDNF 억제 항체, 트로록스 또는 CHX(cycloheximide)를 각각 처리하고, 배지로 배출되는 LDH를 측정하여 신경세포파사를 분석한 그래프이다.

도 6은 피질 신경세포를 세척하여 배양하거나 BDNF를 처리하여 배양한 뒤 산화된 DCDHF-DA(DCF)의 형광 강도를 측정하여 신경의 ROS 수준을 분석하여 나타낸 그래프이다.

도 7은 피질 신경세포를 세척하여 배양, BDNF 단독 처리, BDNF 및 CHX 처리 또는 BDNF 및 트로록스를 처리하여 피질 신경세포에 있는 DCF를 정량화한 그래프이다.

도 8은 BDNF를 시간별로 처리한 피질 신경세포에서 NADPH 옥시다제 및 GAPDH mRNA를 RT-PCR을 수행해 전기영동한 사진이다.

도 9는 BDNF를 시간별로 처리한 피질 신경세포에서 NADPH 옥시다제 및 GAPDH mRNA를 RT-PCR을 수행해 전기영동한 사진으로부터 NADPH 옥시다제 mRNA 수준을 정량화한 그래프이다.

도 10은 피질 신경세포에 BDNF를 시간별로 처리한 후 NADPH 옥시다제 구성인자 및 액틴(actin)을 웨스턴 블랏으로 분석한 그림이다.

도 11은 피질 신경세포를 세척 및 BDNF 처리하여 배양한 후 면역표지한 형광 현미경 사진이다.

A : 세척, FITC가 결합된 항-양 IgG 및 항-p47-phox로 면역표지,

B : 세척, 텍사스 레드가 결합된 항-양 IgG 및 항-NeuN으로 면역표지,

C : BDNF 처리, FITC가 결합된 항-양 IgG 및 항-p47-phox로 면역표지 및

D : BDNF 처리, 텍사스 레드가 결합된 항-양 IgG 및 항-NeuN으로 면역표지.

도 12는 피질 신경세포를 세척 및 BDNF 처리하여 배양한 후 면역표지한 형광 현미경 사진이다.

A : 세척, FITC가 결합된 항-양 IgG 및 항-p67-phox로 면역표지,

B : 세척, 텍사스 레드가 결합된 항-양 IgG 및 항-NeuN으로 면역표지,

C : BDNF 처리, FITC가 결합된 항-양 IgG 및 항-p67-phox로 면역표지 및

D : BDNF 처리, 텍사스 레드가 결합된 항-양 IgG 및 항-NeuN으로 면역표지.

도 13은 피질 신경세포에 BDNF를 시간별로 처리하여 배양한 후 세포질 분획(C) 및 세포질막 분획(M)을 분리하여 항-p47-phox 항체 및 항-p67-phox 항체를 이용해 웨스턴 블랏을 수행한 사진이다.

도 14는 피질 신경세포를 세척, BDNF 처리 및 BDNF 및 DPI 처리하여 배양한뒤 각 시간별로 피질 신경세포에서 사이토크롬 c의 감소를 측정하여 과산화물 생성을 분석한 그래프이다.

도 15은 피질 신경세포를 세척, BDNF 처리 또는 DPI 처리하여 과산화물을 측정한 형광현미경 사진이다.

A : 세척한 피질 신경세포의 산화된 하이드로에티딘(HEt),

B : BDNF를 처리한 피질 신경세포의 산화된 HEt,

C : BDNF 및 DPI를 처리한 피질 신경세포의 산화된 HEt,

D : 세척한 피질 신경세포의 산화된 DCF,

E : BDNF를 처리한 피질 신경세포의 산화된 DCF 및

F : BDNF 및 DPI를 처리한 괴질 신경세포의 산화된 DCF.

도 16은 괴질 신경세포에 BDNF, BDNF+DPI, BDNF+AEBSF 또는 BDNF+2-하이드록시-TTBA를 처리하여 배양한 뒤 배양 배지로 배출되는 LDH를 측정하여 신경세포괴사를 분석한 그래프이다.

도 17은 혈청을 제거한 신경-파다 괴질 신경세포에 무첨가, BDNF, BDNF+DPI, DPI, BDNF+트로록스 또는 트로록스를 처리하여 생존하는 신경의 수를 세어 신경세포고사를 분석한 그래프이다.

### 【발명의 상세한 설명】

#### 【발명의 목적】

#### 【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<40> 본 발명은 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사를 억제하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 산화적 독성 억제제를 투여하여 세포괴사를 억제하는 방법 및 산화적 독성 억제제 및 뉴로트로핀을 투여하여 세포괴사 및 세포고사를 동시에 억제하는 방법에 관한 것이다.

<41> 중추 신경 및 말초 신경은 표적 세포로부터 분비되는 신경성장인자인 뉴로트로핀(neurotrophin)의 지속적 공급에 의해 생존한다(Levi-Montalcini, 1987, *EMBO J.*, 6, 1145-1154; Barde, 1994, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 390, 45-56). 뉴로트로핀의 작용은 티로신 키나제 활성을 가진 뉴로트로핀 수용체 친화도가 높은 TrkB 또는 TrkC와 결합함으로써 시작된다(Patapoutian and Reichardt, 2001, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11, 272-280; Kaplan

and Miller, 2000, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10, 381-391). Trk 티로신 키나제는 소뇌 과립, 피질, 해마, 교감 신경 및 감각 신경과 같은 다양한 신경의 생존에 중요한 역할을 하는 작은 GTP-결합 단백질인 Ras, PI-3K 및 PLC  $\gamma$ 를 활성화시킨다(Borasio et al., 1993, , 121, 665-672; Stephens et al., 1994, *Neuron*, 12, 691-705; Yao and Cooper, 1995, .., 267, 2003-2006; Nobes et al., 1996, *Neuroscience*., 70, 1067-1079; Nonomura ., 1996, *Brain Res Dev Brain Res.*, 97, 42-50; Alcantara et al., 1997, *J Neurosci*., 17(10), 3623-3633; Hetman et al., 1999, *J Biol Chem.*, 274, 22569-22580; Atwal et al., 2000, *Neuron*., 27, 265-227).

<42> 뉴로트로핀은 정상적인 신경계의 분화과정동안 세포의 고사(apoptosis) 또는 예정사(programmed cell death)를 제어하여 신경세포의 생존을 증진시킨다(Barde, 1994, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 390, 45-56; Deshmukh and Johnson, 1997, *Mol. Pharmacol.*, 51, 897-906). 뉴로트로핀의 신경세포 보호효과는 다양한 형태의 신경계 뇌질환의 모델에서 입증이 되고 있다. 예를 들어, 뉴로트로핀은 생체내 축삭절단술 실험에 따른 전뇌 기저의 콜린성 신경세포, 망막 신경절 신경세포, 척수 감각 및 운동 신경세포의 퇴화를 억제하는 것으로 보고되었다(Hefti, 1986, *J. Neurosci.*, 6, 2155-2162; Yan et al., 1993, *J. Neurobiol.*, 24, 1555-1577; Mey and Thanos, 1993,

*Brain Res.*, 602, 304-317; Morse *et al.*, 1993, *J. Neurosci.*, 13, 4146-4156; Cohen *et al.*, 1994, *J. Neurobiol.*, 25, 953-959; Friedman *et al.*, 1995, *J. Neurosci.*, 15, 1044-1056).

신경 성장 인자(NGF), 뇌-유래 신경성 인자(Brain-derived neurotrophic factor, 이하 'BDNF'라 칭함) 및 뉴로트로핀(neurotrophin, 이하 'NT'라 칭함)-3, NT-4/5는 저산소성-허혈성 손상에 따른 신경의 고사를 감소시킬 수 있으며(Shigeno *et al.*, 1991, *J. Neurosci.*, 11, 2914-2919; Beck *et al.*, 1994, *J. Cereb. Blood. Flow Metab.*, 14, 689-692; Chan *et al.*, 1996, *Neurochem. Res.*, 21, 763-767), BDNF는 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 및 6-하이드록시 도파민(6-hydroxy dopamine)으로부터 도파민성 신경을 보호한다(Spina *et al.*, 1992, *J. Neurochem.*, 59, 99-106; Frim *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 5104-5108). 상기 연구로부터 뉴로트로핀이 저산소성-허혈 및 다양한 퇴행성 뇌신경계 질환을 치료하는데 이용될 수 있다는 것을 알 수 있다.

<43> 상기에서 살펴본 바와 같이 뉴로트로핀의 작용인 신경 세포고사 억제 효과를 이용해 신경퇴행성 질병을 치료하려는 노력이 진행되고 있다. 그러나 상기의 신경세포 고사억제 효과를 가진 뉴로트로핀들을 뇌질환의 치료에 응용하는데 제한을 주는 연구결과들이 보고 되고 있다. 예를 들어, BDNF, NT-3 또는 NT-4/5는 허혈성 신경세포의 손상을 악화시키는데, 이는 N-메틸-D-아스파테이트(NMDA) 글루타메이트

수용체를 통한  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입 및 나이트릭 옥사이드(NO)의 생산 증가가 기전으로 제시되었으며 (Fernandez-Sanchez and Novelli, 1993, *FEBS Lett.*, 335, 124-131; Koh *et al.*, 1995, , 268, 573-575; Samdani *et al.*, 1997, *J. Neurosci.*, 17, 4633-4641), BDNF, NGF 및 NT-4/5는 산화적 독성과 아연에 의한 신경세포의 괴사를 현저하게 증가시키는 것으로 밝혀졌다(Gwag *et al.*, 1995, *Neuroreport*, 7, 93-96; Park *et al.*, 1998, *Neuroreport*, 9, 687-690; Won *et al.*, 2000, *Neurobiol Dis*, 7, 251-259).

<44> 최근 본 발명자들은 뉴로트로핀이 상황에 따라 신경세포의 손상을 악화시키는 것은 물론, 배양한 세포는 물론 실험쥐에서 직접적으로 신경세포의 괴사를 유도함을 확인하였다 (Kim *et al.*, 2002, *J Cell Biol*, 159, 821-831). 따라서, 이러한 뉴로트로핀의 예상치 않은 독성작용들은 최근 뉴로트로핀이 신경병증, 루게릭병등의 임상실험에서 사용이 중단되는 상황과 관련이 있을 것으로 예상되었다(Apfel *et al.*, 2001, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 39(4), 351-61).

<45> 이에, 본 발명자들은 뉴로트로핀의 직접적인 독성작용의 기전을 밝히고, 독성작용을 선택적으로 막을 수 있는 억제제를 탐색함으로써 뉴로트로핀의 뇌질환에 대한 치료효과를 극대화 할 수 있는 보완약물을 확보하여 본 발명을 완성하였다.

**【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】**

<46> 본 발명의 목적은 산화적 독성 억제제를 투여하여 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사 를 억제하는 방법 및 산화적 독성 억제제와 뉴로트로핀을 투여하여 세포괴사 및 세포고사를 동시에 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

**【발명의 구성 및 작용】**

<47> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산화적 독성 억제제를 투여하여 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사를 억제하는 방법을 제공한다.

<48> 또한, 본 발명은 산화적 독성 억제제와 뉴로트로핀을 투여하여 세포괴사 및 세포고사를 동시에 억제하는 방법을 제공한다.

<49> 또한, 본 발명은 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체를 유효성분으로 함유하는 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사 억제제를 제공한다.

<50> 또한, 본 발명은 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체 및 뉴로트로핀을 유효성분 으로 함유하는 세포괴사 및 세포고사 동시 억제제를 제공한다.

<51> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<52> 본 발명은 산화적 독성 억제제를 투여하여 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사를 억제 하는 방법을 제공한다.

<53> 본 발명의 산화적 독성(oxidative stress) 억제제는 NADPH 옥시다제 저해제(NADPH oxidase inhibitor), 비타민 E와 그의 유도체 및 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산

(tetrafluorobenzylaminosalicylic acid) 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에서 NADPH 옥시다제 저해제는 디페닐렌 이오도니움(DPI) 및 4-(2-아미노에틸)-벤젠설포닐 플로라이드(AEBSF)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하고, 비타민 E의 유도체는 트로록스(trolox)인 것이 바람직하며, 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산의 유도체는 BAS(5-benzylaminosalicylic acid), TBAS(5-(4-trifluoromethylbenzyl) aminosalicylic acid), NBAS(5-(4-nitrobenzyl) aminosalicylic acid), CBAS(5-(4-chlorobenzyl) aminosalicylic acid), MBAS(5-(4-methoxybenzyl) aminosalicylic acid), FBAS(5-(4-fluorobenxyl) aminosalicylic acid) 및 2-hydroxy-TTBA(2-Hydroxy-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluoromethyl- benzylamino)-benzoic acid, 이하 '2-하이드록시-TTBA'라 칭함)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다.

<54> 본 발명의 뉴로트로핀(neurotrophin)은 NGF(nerve growth factor), BDNF(brain derived-neurotrophic factor), 뉴로트로핀(NT)-3, 또는 NT-4/5인 것이 바람직하며, BDNF인 것이 더욱 바람직하다.

<55> BDNF는 NADPH 옥시다제의 발현을 증가시키고 이로 인해 세포내에 활성산소(reactive oxygen species, 이하 'ROS'라 약칭함)를 과량 생성하여 신경 세포의 괴사를 유도한다.

<56> NADPH 옥시다제 저해제인 디페닐렌 이오도니움(DPI) 또는 4-(2-아모노에틸)-벤젠설포닐 플로라이드(AEBSF)를 처리하면, BDNF에 의해 유도되는 NADPH 옥시다제의 활성을 억제해 ROS의 생성을 감소시키고, 세포괴사를 억제하며, 비타민 E 또는 그의 유도체인 트로록스를 처리하면 항산화작용으로 인해 BDNF에 의해 유도된 세포괴사를 억제한다. 또한, 테트라플루오로벤질아

미노살리실릭산 유도체인 BAS, TBAS, NBAS, CBAS, MBAS, FBAS 및 2-하이드록시-TTBA는 항산화 작용을 하는 물질로 산화적 독성을 억제하여 세포괴사를 억제한다(국제특허 공개: WO 01/79153 호).

<57> 따라서, 본 발명의 산화적 독성 억제제를 투여하면 뉴로트로핀에 의해 유도된 세포괴사 를 억제시킬 수 있다.

<58> 또한, 본 발명은 산화적 독성 억제제와 뉴로트로핀을 투여하여 세포괴사 및 세포고사를 동시에 억제하는 방법을 제공한다.

<59> 본 발명의 산화적 독성 억제제는 NADPH 옥시다제 저해제, 비타민 E 유도체 및 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기에 서 NADPH 옥시다제 저해제는 디페닐렌 이오도니움(DPI) 및 4-(2-아모노에틸)-벤젠설포닐 플로라이드(AEBSF)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하고, 비타민 E의 유도체는 트로록스인 것이 바람직하며, 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산의 유도체는 BAS, TBAS, NBAS, CBAS, MBAS, FBAS 및 2-하이드록시-TTBA로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다.

<60> 본 발명의 뉴로트로핀은 NGF, BDNF, 뉴로트로핀(NT)-3, 또는 NT-4/5인 것이 바람직하며, BDNF인 것이 더욱 바람직하다.

<61> BDNF는 세포고사를 억제하지만 동시에 세포괴사를 일으킨다. 하지만 BDNF와 함께 산화 적 독성 억제제를 투여하면, BDNF에 의해 세포고사가 억제되고 동시에 산화적 독성 억제제에

의해 세포괴사가 억제된다. 이때 산화적 독성 억제제는 BDNF에 의한 세포고사의 억제에는 영향을 미치지 않는다. 따라서, BDNF 및 산화적 독성 억제제를 함께 처리하면 세포괴사 및 세포고사를 동시에 억제시킬 수 있다.

<62> 즉, 본 발명의 산화적 독성 억제제 및 뉴로트로핀을 투여하면 세포괴사 및 세포고사와 관련된 질환인 허혈성 뇌졸중(Holtzman *et al.*, 1996, *Ann. Neurol.*, 39(1), 114-122; Ferrer *et al.*, 2001, *Acta neuropathol. (Berl.)*, 101(3), 229-38), 퇴행성 척추손상(Jin *et al.*, 2002, *Exp. Neurol.*, 177(1), 265-75), 알츠하이머성 치매(Siegel and Chauhan, 2000, *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 33, 2-3), 파킨슨병(Bradford *et al.*, 1999, *Adv. Neurol.*, 80, 19025), 류게릭병(Louvel *et al.*, 1997, *Trends. Pharmacol. Sci.*, 18(6), 196-203), 신경병증(Apfel, 1999, *Brain Pathol.*, 9(2), 393-413), 헌팅تون병(Perez-Navarro *et al.*, 2000, *J. Neurochem.*, 75(5), 2190-9), 녹내장(Ko *et al.*, 2000, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41(10), 2967-71) 및 망막박리(Lewis *et al.*, 1999, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40(7), 1530-1544) 등에서 약리효과를 가질 수 있다.

<63> 또한, 본 발명은 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체를 유효성분으로 함유하는 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사 억제제를 제공한다.

<64> 상기에서 살펴본 바와 같이 산화적 독성 억제제는 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사를 억제한다. 따라서, 산화적 독성 억제제인 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체를 이용하여 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사 억제제를 제조할 수 있다. 본 발명의 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체는 BAS, TBAS, NBAS, CBAS, MBAS, FBAS 및 2-하이드록시

-TTBA로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다. 본 발명의 뉴로트로핀은 NGF, BDNF, 뉴로트로핀(NT)-3, 또는 NT-4/5인 것이 바람직하며, BDNF인 것이 더욱 바람직하다.

<65> 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품제제의 형태로 사용될 수 있다. 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 층진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 혼탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 혼탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 혼탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<66> 또한, 본 발명은 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체 및 뉴로트로핀을 유효성분으로 함유하는 세포괴사 및 세포고사 동시 억제제를 제공한다.

<67> 산화적 독성 억제제인 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체는 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사를 억제하고, 뉴로트로핀은 세포고사를 억제하며, 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체는 뉴로트로핀에 의해 억제된 세포고사에 영향을 미치지 않기 때문에 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체 및 뉴로트로핀을 유효성분으로 함유하는 세포괴사 및 세포고사 동시 억제제를 제조할 수 있다.

<68> 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산의 유도체는 BAS, TBAS, NBAS, CBAS, MBAS, FBAS 및 2-하이드록시-TTBA로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하다.

<69> 본 발명의 뉴로트로핀은 NGF, BDNF, 뉴로트로핀(NT)-3, 또는 NT-4/5인 것이 바람직하며, BDNF인 것이 더욱 바람직하다.

<70> 본 발명의 세포괴사 및 세포고사 동시 억제제는 세포괴사 및 세포고사와 관련된 질환인 허혈성 뇌졸중, 퇴행성 척추손상, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 루게릭병, 신경병증, 헌팅تون병, 녹내장 또는 망막박리에서 약리효과를 가질 수 있다.

<71> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<72> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<73> <실시예 1> 일차 피질 신경세포의 배양

<74> 본 발명자들은 뉴로트로핀에 의한 신경독성을 확인하기 위해 흰쥐의 대뇌 피질 신경세포를 배양하였다. 임신한지 17일된 흰쥐의 태아의 뇌로부터 분리한 대뇌 피질 신경세포를 이글스 최소 구성 배지(MEM), 5% 말 혈청(horse serum), 5% 송아지 태아 혈청(fetal calf serum), 21 mM 글루코스, 26.5 mM 바이카보네이트 및 2 mM L-글루타민을 함유하는 배지(Gibco BRL)를 이용해 배양하였다.

<75> 신경 세포-신경교 세포의 혼합 배양을 위해, 시험관내에서 배양한지 5 내지 7일(days in vitro(DIV)5-7)에 10  $\mu$ M 사이토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside, Ara C)를 첨가하여 비-신경 세포의 과잉 성장을 중지시켰다. 2일 후, 말혈청을 첨가하지 않은 배지로 바꾸어 주었다. 세포는 37°C로 유지되고, 5%의 CO<sub>2</sub>로 유지되는 배양기에서 배양하였다. 한편, 순수 신경 세포(>95%)배양을 위해, 광의 방법(Gwag et al., 1997, *Neuroscience*, 77, 393-401)에 따라 배양한 지 2 내지 3일(DIV 2 내지 3)에 2.5  $\mu$ M 사이토신 아라비노사이드를 첨가하여 배양하였다.

<76> <실시예 2> 뉴로트로핀의 지속 처리에 따른 세포괴사의 유도 및 분석

<77> 본 발명자들은 뉴로트로핀이 세포괴사를 유도하는지 알아보기 위해, 피질 신경세포에 뉴로트로핀을 처리해 세포 배양액으로 분비되는 락테이트 디하이드로즈네이즈(lactate dehydrogenase, 이하 'LDH'라 칭함)의 수준을 분석하여 세포괴사를 분석하였다.

<78> 상기 실시예 1의 방법으로 혼합 배양한 대뇌피질 신경 세포(DIV 12 내지 14)에 10, 30 또는 100 ng/ml의 뇌 유도 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, 이하 'BDNF') 또는 뉴로트로핀(neurotrophin, 이하 'NT'라 칭함)-3을 첨가하여 배양하였다. 배양 배지로 분

비되는 LDH의 수준을 정량함으로써 신경세포괴사를 분석하였다. 신경세포괴사의 백분율은 대조군(0%로 표기) 또는 24시간 동안 500  $\mu$ M의 N-메틸-D-아스파테이트(N-methyl-D-aspartate, NMDA)를 첨가하여 24시간 이내에 완벽한 신경 세포괴사를 한 군(100%로 표기)에 따라 평균 LDH 값으로 정량화하였다.

<79> 그 결과, BDNF, NT-3, 또는 NT-4/5를 36시간 내지 48시간 동안 지속적으로 처리하여 배양했을 때는 광범위한 신경세포괴사가 일어났고, BDNF, NT-3 또는 NT-4/5를 48시간 동안 처리하였을 때 완전한 신경세포괴사가 일어났다(도 1의 A, 도 1의 B, 도 1의 C).{평균  $\pm$  SEM(각 조건당 배양 월의 수, n=16), \* 비교 대조군(동시에 세척한 대조군)과 비교하여 상당한 차이가 있는 것으로 스튜던트-뉴만-클 테스트(Student-Neuman-Keuls test)를 통해 P < 0.05의 유의성을 보였다.

<80> 따라서, 뉴로트로핀인 BDNF, NT-3 또는 NT-4/5는 세포괴사를 유도함을 알 수 있다.

<81> <실시예 3> BDNF의 선상 주입에 따른 세포괴사의 분석

<82> 본 발명자들은 BDNF에 의한 세포괴사를 확인하기 위해 쥐 뇌의 선조체에 BDNF를 주입하였다. 구체적으로, 250 내지 300g의 무게를 가진 수컷 흰쥐를 마취한 뒤 5  $\mu$ l 생리식염수 및 생리식염수에 녹인 5  $\mu$ g BDNF를 2일 동안 선상 주입하였다(선상주입 위치 : 문쪽에서 전정으로 1.0 mm, 측위에서 중앙으로 3.0 mm, 경막 표면에서 복측으로 5.0 mm). 주입 후 2일 후에 뇌를 절단하여 400 mg/ml 클로랄 하이드레이트(chloral hydrate)를 복강내 주입하여 마취시킨 뒤 인산-완충 생리식염수(PBS), 그에 이어 3% 파라포름알데하이드를 심장투과로 관류시켰다. 곧바

로 뇌를 제거하여 고정한 후, 마이크로톰(TPI사)을 이용하여 8  $\mu\text{m}$  두께로 절단하였다. 주입 부위를 포함하는 절단 절편을 모아서 헤마톡실린 및 에오신(Hematoxylin and Eosin, 이하 'H&E'라 칭함)을 이용해 염색하였다. 병변 부위는 원의 방법(Won et al., 2000, , 7, 251-259)에 따라 분석하였다. 주사바늘이 통과한 위치 및 염색 양상에 있어서 신경 세포의 사멸이 일어난 손상부위를 포함하는 6개의 단계적인 절단 절편을 관찰하였다. H&E로 염색한 뇌 조직 절편은 컴퓨터 영상 분석 기기(시그마스캔사)를 이용해 분석하였다.

<83> 그 결과, BDNF를 주입한 쥐의 뇌 신경 조직에서 신경세포의 사멸이 일어났음을 확인할 수 있었고, 이러한 손상이 일어난 부위의 면적을 측정하여 분석한 결과 BDNF를 주입한 쥐의 병변 조직은 생리 식염수만 주입한 쥐의 병변 조직보다 더 큰 세포괴사를 나타내었다(도 2).

<84> <실시예 4> BDNF 처리한 피질 신경세포의 세포괴사 관찰

<85> 본 발명자들은 BDNF 처리에 따른 신경 세포괴사의 양상을 확인하기 위해 100 ng/ml BDNF를 32시간 동안 지속적으로 처리한 대뇌 피질 신경세포 및 BDNF를 처리하지 않은 대조군을 위상차 현미경 및 투과 전자 현미경을 이용하여 관찰하였다.

<86> 투과 전자 현미경을 이용한 관찰은, 세포 배양액을 카르노프스키(Karnovskys) 고정 용액(1% 파라포름알데히드(paraformaldehyde), 2% 글루타알데히드(glutaldehyde), 2 mM 칼슘 클로라이드(calcium chloride) 및 100 mM 카코디레이트 완충액(cacodylate buffer) pH 7.4)에 2시간동안 고정시키고, 카코디레이트 완충액으로 세척한 뒤, 1% 오스미움 테트록사이드(osmium tetroxide) 및 1.5% 포타슘 폐로시아나이드(potassium ferrocyanide)로 1시간 동안 후-고정을

하였다. 상기 고정된 세포는 0.5% 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 전체적으로 염색하고, 단계적인 농도의 알콜로 탈수시키고, 폴리/베드 812 레진(Poly/Bed 812 resin)(펠코사)로 봉매하였다. 상기 봉매된 세포는 레이서트 정 올트라컷 S(Reichert Jung Ultracut S)(레이카사)를 이용해 절단하였다. 상기 절단된 세포를 우라닐 아세테이트 및 리드 사이트레이트(lead citrate)로 염색하여, 투과전자현미경을 이용해 세포를 관찰하고 제이스 EM 902A(Zeiss EM 902A)를 이용해 사진을 찍었다.

<87> 위상차 현미경을 통해 관찰한 결과, BDNF의 처리에 의해 신경세포의 팽창이 일어났고(도 3의 A 및 B), 투과전자 현미경으로 관찰한 결과 BDNF의 처리에 의해 세포괴사의 형태로 핵 염색질이 산만하게 응축되고, 핵막의 손상은 일어나지 않은 반면, 세포질 막이 파열됨을 알 수 있었다(도 3의 C 및 D). 또한, 투과전자현미경을 통한 관찰로 대조군 및 BDNF를 처리한 신경 세포에서 정상, 세포괴사 또는 세포고사 (세포질이 수축하고, 핵막이 세포질막보다 먼저 파열)의 소견이 보인 퇴행한 신경을 분류한 결과 BDNF에 의해 세포괴사가 유도됨을 알 수 있었다(도 4).

<88> <실시예 5> BDNF를 피질세포에 처리에 따른 ROS의 생성 분석

<89> 활성 산소종(reactive oxygen species, 이하 'ROS'라 칭함)이 증가하면 세포괴사가 유도 된다고 널리 알려져 있어, 본 발명자들은 BDNF를 처리해 유도된 세포괴사가 ROS의 생산이 증가되어 일어난 것인지 확인하고자 하였다.

<90> 100 ng/ml BDNF, 100 ng/ml BDNF 및 1 µg/ml 사이클로헥사마이드(cycloheximide, 이하 'CHX'라 칭함), 100 ng/ml BDNF 및 100 µM 트로록스(trolox)를 처리하여 배양한 피질 신경세포(DIV 12 내지 15)에 10 µM 디클로로하이드로 플로레신 디아세테이트(dichlorodihydro fluorescein diacetate, 이하 'DCDHF-DA'라 칭함) 또는 5 µM 하이드로에티듐(hydroethidium, 이하 'HEt'라 칭함)(Molecular Probe)을 포함하는 2% 플루로닉 F-127이 첨가된 HEPES-완충 염조절 용액(HCSS)(120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 mM 글루코스, 20 mM HEPES 및 10 mM NaOH)을 첨가하였다. 상기 세포는 37°C에서 20분간 배양하였고, HCSS 완충용액으로 3회 세척하였다. 100 W 제논 램프 및 여과기(산화된 DCDHF를 위한 것; 여기=488 nm, 방출=510 nm, HEt를 위한 것; 여기=546 nm, 방출=590 nm)를 포함하고 있는 니콘 디아포트 반전 현미경(Nikon Diaphot inverted microscope)으로 산화된 DCDHF의 형광 신호를 실온에서 관찰하였다. 형광 영상은 쿤티셀 700 시스템(Quanticell 700 system)(Applied Imaging, 영국)을 이용하여 분석하였다.

<91> 그 결과, BDNF의 처리에 따라 ROS의 생산이 증가하고, BDNF와 함께 단백질 합성 저해제인 CHX 또는 비타민 E 유도체인 트로록스를 처리함에 따라 BDNF에 의해 증가한 ROS의 생산이 감소함을 알 수 있었다(도 6, 도 7). {평균 ± SEM(각 조건당 임의로 선택된 신경세포의 수, n=30 내지 35), \* ; BDNF를 처리하지 않은 대조군과 상당한 차이가 있는 것이고, # ; BDNF 비교 대조군(BDNF만 처리한 대조군)과 상당한 차이가 있는 것으로, 스튜던트-뉴만-클 테스트를 통해 P<0.05에서 큰 차이를 보이는 결과}

<92> 따라서, BDNF는 전-산화제 단백질의 합성을 통해 ROS를 생산함을 알 수 있다.

<93> <실시예 6> BDNF에 의해 유도되는 ROS의 생성을 차단한 세포괴사 억제 분석

<94> 본 발명자들은 BDNF에 의해 유도되는 신경세포괴사의 작용 기작을 확인하기 위해 피질 신경세포(DIV 12 내지 15)에 100 ng/ml BDNF 단독, 100 ng/ml BDNF 및 100 µg/ml 항-BDNF 억제 항체, 100 ng/ml BDNF 및 100 µM 트로록스, 또는 100 ng/ml BDNF 및 1 µg/ml CHX를 각각 처리하고, 36시간 후 배양배지로 배출되는 LDH를 측정하여 신경세포괴사를 분석하였다.

<95> 그 결과, BDNF의 처리에 의해 유도된 세포괴사로 증가된 LDH의 분비는 항-BDNF 차단 항체의 투입에 의해 완벽히 차단되었으며, 단백질 합성 저해제인 CHX 및 항산화제인 트로록스의 처리에 의해 BDNF에 의해 유도된 세포괴사를 완벽히 차단하였다(도 5). {평균 ± SEM(각 조건당 배양 웨의 수, n=16), \* ; 비교 대조군(BDNF만을 처리한 대조군)과 상당한 차이가 있는 것으로 스튜던트-뉴만-클 테스트를 통해 P<0.05에서 큰 차이를 보이는 결과}

<96> 따라서, BDNF에 의해 유도된 세포괴사는 ROS를 생성하는 산화적 스트레스 과정을 억제 함으로써 차단됨을 알 수 있다.

<97> <실시예 7> BDNF를 처리한 피질세포에서의 표적 유전자 분석

<98> <7-1> cDNA 마이크로어레이 분석을 통한 BDNF의 표적 유전자 분석

<99> 본 발명자들은 BDNF를 처리한 피질세포에서 발현되는 유전자 및 유전자의 발현의 변화를 보기 위하여 cDNA 마이크로어레이 분석을 하였다.

<100> BDNF를 8시간 동안 첨가하여 배양한 피질 신경세포(DIV 12)로부터 RNazol B(텔테스트사)를 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 상기 분리한 전체 RNA 1  $\mu$ g을 [ $\alpha$ - $^{33}$ P]dATP로 방사성 표지하여 cDNA를 합성하고 쥐 유전자 여과지(rat gene filter membranes)(리서치 제네틱스사)에 42°C로 12 내지 18시간 동안 혼성반응 시켰다. 상기 혼성 반응된 여과지는 2  $\times$ salrin 소듐 시트레이트(saline sodium citrate) 완충액 및 1% 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate)로 50°C에서 20분 동안 세척하고, 0.5  $\times$ salrin 소듐 시트레이트 및 1% 소듐 도데실 설페이트로 실온에서 15분 동안 세척한 후, 플라스틱 랩으로 감싸고, 포스포이미지 카세트(phosphor imager cassette)에 노출시켰다. 유전자 여과지를 노출하고 난 뒤, 혼성이 된 형태는 마이크로어레이 분석 소프트웨어(Pathways<sup>TM</sup>4-universal microarray analysis software)(인비트로젠사)를 이용하여 분석하였다.

<101> 그 결과, BDNF의 표적 유전자는 대부분 분화, 세포내 이입, 대사 및 뉴로트로핀의 신경 독성 작용을 반영하는 신호전달에 있어서 중요한 역할을 하는 유전자 인것으로 밝혀졌으며 이를 중 산화적 독성에 관여하는 유전자로 NADPH 옥시다제(oxidase)의 발현이 증가함을 알 수 있었는데 이 유전자는 세포내에 활성산소의 선구물질을 만들어 내는 것으로 알려져 있다.

<102> <7-2> 역전사-효소연쇄증합반응(RT-PCR)을 통한 BDNF 표적 유전자의 확인

<103> 본 발명자들은 상기 실시예 <7-1>의 cDNA 발현 마이크로어레이로부터 BDNF-민감성 유전자로 나타난 유전자로, 산소로부터 과산화물을 생산하는 전-산화제 효소인 NADPH 옥시다제의

소단위인 p22-phox(p22-phox) 및 gp91-phox(gp91-phox)로 구성되는 사이토크롬 b<sub>558</sub>을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

<104> BDNF를 괴질 신경세포에 처리한 후 시간별로 샘플을 채취하여 전체 RNA를 분리하고 cDNA를 제조하기 위해 1 µg의 전체 RNA를 반응 혼합액(각각 2.5 mM의 dNTP, 0.5 단위 RNasin, 100 ng 올리고 dT 프라이머) 및 200 단위 MMLV 역전사효소를 이용하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 상기의 반응액은 92°C에서 10분 동안 반응시키고 4°C로 옮겼다. 역전사된 cDNA는 공지된 방법(다까라 슈조사)에 따라 PCR을 수행했다. PCR 반응의 순서는 다음과 같다. 순서대로 DNA의 변성, 프라이머 결합, 길이연장; p47-phox: 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 60초로 28회, p22-phox(マイクロアレイ에서 사이토크롬 b<sub>558</sub>과 상동성이 있음) 및 gp91-phox: 94°C에서 45초, 60°C에서 60초, 72°C에서 120초로 33회, GAPDH: 94°C에서 35초, 55°C에서 45초, 72°C에서 90초로 25회. 상기의 PCR 수행시 사용한 프라이머는 하기에 기재되는 서열번호의 염기서열로 구성된다. p22-phox: 서열번호 1 및 서열번호 2, p47-phox: 서열번호 3 및 서열번호 4, gp91-phox: 서열번호 5 및 서열번호 6, GAPDH: 서열번호 7 및 서열번호 8. 상기 과정을 통한 PCR 산물은 1.2% 아가로즈 젤을 이용해 전기영동하고 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)를 이용해 시각화하였다. mRNA의 상대적인 양은 LAS-1000(후지포토필름사)을 이용해 측정하고, GAPDH mRNA의 수준에 비교해 정량화 하였다. 상기 RT-PCR로 발현의 변화가 확인된 유전자의 PCR이 정확하게 수행된 것인지 확인하기 위해 DNA 염기서열 분석을 하였다. DNA 염기서열 분석은 퍼킨-엘머 어플라이드 바이오시스템(Perkin-Elmer Applied Biosystems)에 들어 있는 빅 다이 터미네이터 케미스트리(Big Dye Terminator Chemistry)를 사용해 DNA 서열분석기(ABI PRISM™377 DNA sequencer, 포스터 시티사)로 수행하였다.

<105> 그 결과, BDNF를 처리한 후 2시간 이내에 p22-phox 및 gp91-phox의 mRNA의 수준이 증가하고, 4시간 이후에 최고로 증가하고, 이후 12시간까지 지속되었다. p47-phox 소단위의 mRNA 수준은 BDNF의 첨가 이후 30분부터 점차 증가하였다(도 8, 도 9).

<106> 따라서, BDNF는 NADPH 옥시다제의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다.

<107> <7-3> 웨스턴 블랏을 통한 BDNF 표적 단백질의 분석

<108> 본 발명자들은 상기 실시예 <7-2>를 통해 BDNF의 표적 유전자로 판명된 NADPH 옥시다제의 구성 유전자가 단백질로도 발현이 되는지 확인하기 위해 웨스턴 블랏을 수행하였다.

<109> 100 ng/ml BDNF를 시간별로 처리하여 배양된 피질 신경세포는 용해 완충액(50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 0.5% 테옥시콜릭산(deoxycholic acid), 0.1% SDS, 1 mM 폐닐메틸설포닐 플로라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 10 µg/ml 펩스타인 A(pepstain A) 및 100 µg/ml 류펩틴(leupeptin))을 이용하여 용해시켰다. 25 µg의 단백질을 12% SDS-폴리아크릴아마이드 젤(SDS-polyacrylamide gel)에 전기영동하고 나이트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 옮겼다. 상기의 블랏(단백질이 포함된 막)을 2.5% 소 혈청 알부민에 넣어 1시간 동안 반응시키고, 1:1000 비율로 희석한 양 다클론 일차 항체, 항-gp91-phox, 항-p67-phox 또는 항-p47-phox 항체(산타크루즈사)에서 반응시키고, 바이오틴화된 항-양 이차 항체로 반응시켰다. 면역반응성은 벡타스테인 ABC 키트(Vectastain ABC kit)(벡터 레버리토리사) 및 발색 반응기(luminol for enhanced chemiluminescence, ECL)(인트론사)를 이용하여 확인하였다. 면역반응이 나타난 신호는 LAS-1000 시스템(후지 포토필름사)을 이용하여 정량적 농도를 분석하였다.

<110> 그 결과, 피질 신경세포에서 BDNF를 첨가하여 배양한 후 16 내지 32시간동안 NADPH 옥시다제 소단위의 구성인자인 gp91-phox, p47-phox 및 p67-phox 단백질 발현이 증가하였다(도 10).

<111> 따라서, BDNF에 의해 NADPH 옥시다제의 유전자가 발현되고, 단백질로 합성이 됨을 알 수 있다.

<112> <7-4> 면역세포화학 분석을 통한 BDNF 표적유전자 NADPH 옥시다제의 발현 분석

<113> 본 발명자들은 상기 실시예 <7-2> 및 <7-3>을 통해 BDNF에 의해 발현이 증가한 NADPH 옥시다제의 발현을 세포에서 관찰하기 위해 면역세포화학 분석을 실시하였다.

<114> 100 ng/ml BDNF를 처리하여 32시간 배양한 피질 신경세포(DIV 12 내지 14)는 4% 파라포름알데하이드로 30분간 고정화하고, 10% 말 혈청으로 1시간 동안 반응하고, 신경세포의 지표로 쓰이는 NeuN에 대한 생쥐 단일클론 항체(1:400 희석, 케미콘사) 및 p47-phox 또는 p67-phox에 대한 염소 다클론 항체(1:200 희석, 산타크루즈사)로 양쪽-면역표지하여 2 내지 4시간동안 반응시켰다. 상기 반응된 세포는 플로레신 아이소시오시아네이트(fluorescein isothiocyanate)로 결합된 항-생쥐 IgG(1:200 희석, 오가톤 텍니카사) 및 텍사스 레드(Texas red)로 결합된 항-생쥐 IgG(1:200 희석, 벡터 레버러토리사)를 이용해 1 내지 2시간 동안 반응시켰다. 상기 염색된 세포에서 형광을 띤 영상을 모아 리얼-14™프리시전 디지털 카메라(Real-14™precision digital camera)(아포지 인스트루먼트사) 및 이미지프로 플러스 플러그인(ImagePro Plus Plug-in)(실버 스프링사)를 장착한 형광 현미경(제이스사)을 이용하여 분석하였다.

<115> 그 결과, 피질 신경세포에 BDNF를 처리하여 32시간 배양한 신경 세포는 대조군에 비해 p47-phox 및 p67-phox의 신호가 상당히 증가하였고, 이는 신경 세포를 나타내는 NeuN이 있는 세포에서만 증가한 것으로 보아 신경 세포에서 단백질 발현이 증가되었음을 알 수 있다(도 11, 도 12).

<116> <7-5> BDNF를 처리한 세포 내부의 분획에 따른 NADPH 옥시다제의 발현 분석

<117> 본 발명자들은 NADPH 옥시다제의 활성화는 세포질의 p47-phox 및 p67-phox 소단위를 세포질 막으로 이동시키는 것과 관련이 있기 때문에(Clark *et al.*, 1989, *Trans. Assoc. Am. Physicians.*, 102, 224-230) BDNF를 처리한 피질 신경세포의 세포질 및 세포질 막의 분획을 이용해 NADPH 옥시다제가 활성화되었는지를 확인하고자 하였다.

<118> 배양한 대뇌 피질 신경세포(DIV 12)에 100 ng/ml BDNF를 시간별로 처리한 뒤 차가운 PBS로 세척하고, 등장액(10 mM HEPES(pH 8.0), 250 mM 수크로스(sucrose), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, 100 µg/ml 류펩틴 및 10 µg/ml 펩스타틴 A)에 혼탁하여 용해시켰다. 세포질 및 세포질 막 분획을 분리하기 위해, 상기 용해액을 호모게나이저(homogenizer)(콘테사)를 이용하여 균질화하고, 9,000 g에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 100,000 g에서 1시간동안 원심 분리하였다. 원심 분리후, 펠렛을 50 µl 용해 완충액으로 혼탁하여 세포질막 분획을 수득하였고, 상등액으로부터 세포질 분획을 수득하였다.

<119> 상기 방법으로 수득한 세포질 및 세포질 막 분획으로부터 단백질을 분리하여 p47-phox 및 p67-phox의 항체를 이용하여 상기 실시예 <7-4>에서 제시하는 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였다.

<120> 그 결과, 피질 신경세포의 세포질 분획에서는 p47-phox 및 p67-phox 단백질 수준은 감소하였지만, 상기 피질 신경세포의 세포질 막 분획에서는 p47-phox 및 p67-phox 단백질이 증가하였다(도 13).

<121> 따라서, BDNF를 처리하면 세포질 막에서 NADPH 옥시다제의 발현이 증가하여 세포 내에 활성 산소종의 발생이 증가하여 산화적 독성이 일어남을 알 수 있다.

<122> <실시예 8> BDNF를 처리한 세포에서의 NADPH 옥시다제의 활성 측정

<123> 본 발명자들은 BDNF를 처리한 세포에서 발현이 증가한 NADPH 옥시다제의 활성이 증가하는지 분석하기 위해, NADPH 옥시다제의 활성에 의해 생성되는 과산화 생성물을 측정하였다.

<124> 과산화 생성물은 사이토크롬 c의 감소를 측정하여 정량 역학 분석을 함으로써 측정하였다(Mayo and Curnutte., 1990, *Method Enzymol.*, 186, 567-575). 미처리, 100 ng/ml BDNF 또는 100 ng/ml BDNF 및 3 nM 디페닐렌 이오도니움(diphenylen iodonium, 이하 'DPI'라 칭함)를 처리하여 배양한 뒤 각 시간별로 피질 신경세포를 PBS에 혼탁하고, 반응 혼합액(0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> 및 7.5 mM 글루코스(glucose)), 75 μM 사이토크롬 c(시그마사) 및 60 μg/ml 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase, SOD)(시그마사)를 첨가하여 37°C에서 3분간 반응시켰다. 서모맥스 마이크로플레이트 판독기(Thermomax microplate reader) 및 SOFTMAX Version 2.02 소프트웨어(몰클라 디바이스사)를 이용하여 550 nm의 파장에서 사이토크롬 c의 흡광도를 측정하여 과산화 생성물을 확인하였다.

<125> 그 결과, BDNF를 처리한 뒤 시간이 지남에 따라 과산화물의 생산이 증가하였고, NADPH 옥시다제 억제제인 DPI를 처리하였을 때 과산화물이 생성되지 않은 양상을 보였다(도 14). {평균  $\pm$  SEM(각 조건당 웨일 수, n=12). \* ; 비교 대조군(세척한 대조군)과 상당한 차이가 있는 것으로, 스튜던트-뉴만-클 테스트를 통해 P<0.05에서 큰 차이를 보이는 결과}

<126> 따라서, BDNF에 의해 NADPH 옥시다제가 활성화되고 이에 따라 과산화물이 생성되는데 이는 NADPH 옥시다제 억제제에 의해 차단됨을 알 수 있다.

<127> <실시예 9> NADPH 옥시다제에 의한 ROS 생성의 확인

<128> NADPH 옥시다제에 의해 ROS가 생성된다고 보고되었기 때문에 본 발명자들은 BDNF를 처리하여 활성화된 NADPH 옥시다제에 의해 ROS가 생성되는지 확인하고자 하였다.

<129> 피질 신경세포를 세척, 100 ng/ml BDNF 처리, 100 ng/ml BDNF 및 3 nM DPI 처리하여 32시간 동안 배양한 뒤 상기 실시예 5의 방법에 의해 HET 및 DCDHF이 각각 에티듐 및 DCF으로 산화되는 것을 측정함으로써 NADPH 옥시다제의 활성을 통한 ROS 생성 능력을 측정하였다.

<130> 그 결과, BDNF를 처리한 세포에서는 HET 및 DCF의 발현이 모두 증가하였고 BDNF 및 NADPH 옥시다제 억제제인 DPI를 처리하자 상기 HET 및 DCF의 생성이 모두 억제되었다 (도 15).

<131> 따라서, BDNF는 NADPH 옥시다제를 매개로 한 과산화물의 생산을 통해 피질 신경에서 산화적 스트레스를 생산함을 알 수 있다.

<132> <실시예 10> NADPH 옥시다제 저해제 처리로 인한 BDNF에 의해 유도되는 세포괴사의 억제

<133> 본 발명자들은 NADPH 옥시다제 저해제가 BDNF에 의해 유도되는 신경세포괴사를 억제하는지 확인하고자 하였다.

<134> 피질 신경세포에 100 ng/ml BDNF, 100 ng/ml BDNF 및 3 nM DPI, 100 ng/ml BDNF 및 10  $\mu$ M AEBSF(4-(2-aminoethyl)-benzensulfonyl fluoride(이하 'AEBSF'라 칭함) 또는 1  $\mu$ M 2-하이드록시-TTBA(2-Hydroxy-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluoromethyl-benzylamino)-benzoic acid, 이하 '2-하이드록시-TTBA'라 칭함)을 처리하여 36시간 동안 배양한 뒤 배양 배지로 배출되는 LDH를 측정하여 신경세포괴사를 분석하였다

<135> 그 결과, 피질 신경세포에 BDNF만 처리했을 때 보다, 3 내지 10 nM DPI, 10 내지 30  $\mu$ M AEBSF(NADPH 옥시다제 저해제), 또는 1  $\mu$ M 2-하이드록시-TTBA를 BDNF와 동시에 처리한 경우, 신경 세포의 괴사가 억제되었다(도 16). {평균  $\pm$  SEM(각 조건당 웨일의 수, n=16). \* ; 비교 대조군(BDNF만 처리한 대조군)과 상당한 차이가 있는 것으로, 스튜던트-뉴만-클 테스트를 통해 P<0.05에서 큰 차이를 보이는 결과}.

<136> 따라서, NADPH 옥시다제 억제제는 BDNF에 의해 유도되는 세포괴사를 억제하므로, BDNF에 의한 세포괴사는 NADPH 옥시다제에 의해 막개됨을 알 수 있다.

<137> <실시예 11> BDNF에 의한 세포고사의 억제에 미치는 영향

<138> 본 발명자들은 BDNF가 세포고사(necrosis)를 억제한다고 알려져 있어, BDNF의 작용을 억제할 수 있는 억제제들을 사용해 BDNF에 의해 유도되는 세포고사의 억제에도 영향을 주는지 알아보고자 하였다.

<139> 순수 배양한 대뇌 피질 신경 세포에 혈청(serum)을 제거한 후 100 ng/ml BDNF, 100 ng/ml BDNF 및 3 nM DPI, 3 nM DPI, 100 ng/ml BDNF 및 100 μM 트로록스 또는 100 μM 트로록스를 처리하여 신경세포 고사가 억제되는지를 확인하기 위해 24 내지 48시간에 생존하는 신경의 수를 세어 세포고사를 분석하였다. 혈청을 제거한 상태에서의 실험을 하기 위해 순수 배양 신경 세포(DIV 7)를 혈청이 없고, MEM에 21 mM 글루코스, 26.5 mM 바이카보네이트와 1 μM MK-801을 넣은 배지(Gwag et al., 1995, *Neuroreport*, 7, 93-96)에서 배양하였다.

<140> 그 결과, BDNF는 24 시간에서는 신경세포의 고사를 효과적으로 억제하였으나 48시간에서는 신경세포의 고사를 억제하지 못하고 세포 팽창을 동반한 신경세포의 괴사 양상을 나타내었다. 또한, DPI 또는 트로록스 자체로는 혈청 제거로 유도된 신경세포고사를 억제하지 못하였다. 흥미롭게도, BDNF를 처리함으로써 일어나는 신경 세포고사의 억제는 DPI 또는 트로록스를 동시에 함께 처리함에 따라 24시간과 48시간에서 효과적으로 억제되었다(도 17). {평균 ± SEM(각 조건당 4개의 웨로부터 임의로 선택한 부위의 수, n=16). \* ; 비교 대조군(혈청을 제거한 대조군)과 상당한 차이가 있는 것으로, 스튜던트-뉴만-클 테스트를 통해 P<0.05에서 큰 차이를 보이는 결과}

<141> 따라서, BDNF는 세포 고사를 효과적으로 억제하나 시간이 지남에 따라 세포의 괴사를 유도하며, BDNF가 일으키는 세포고사를 조절하는 기작은 독립적으로 일어남을 알 수 있다. 상기 결과들로부터 NADPH 옥시다제의 발현과 활성을 통해 BDNF에 의한 세포의 괴사가 유도됨을 알 수 있다. 또한, BDNF의 억제제는 BDNF에 의한 세포고사의 억제에 영향을 주지 않으면서 BDNF에 의한 세포괴사의 유도를 억제할 수 있음을 알 수 있다.

<142> 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 산화적 독성 억제제는 뉴로트로핀에 의해 유도된 세포괴사를 억제하고, 산화적 독성 억제제 및 뉴로트로핀을 동시에 처리하면 세포괴사 및 세포고사를 동시에 억제시킬 수 있어 세포괴사 및 세포고사와 관련된 질환의 예방에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

<143> 이하, 본 발명의 산화적 독성 억제제 및 뉴로트로핀이 적용될 수 있는 구체적인 질환에 대하여 설명한다.

<144> <적용예 1> 알츠하이머병(Alzheimer's disease: AD)

<145> 알츠하이머병은 대뇌피질 및 해마에 있는 글루타민성 뉴런(glutamatergic neurons)과 전뇌 기저에 있는 콜린성 신경세포(cholinergic neurons)의 괴사를 수반하며, 신경세포 밖의 아밀로이드 플라그(amyloid plaque)와 신경세포 안의 신경섬유의 엉킴(neurofibrillary tangles)이 공통적인 현상으로 발견된다. 뉴로트로핀인 NGF는 콜린성 신경세포의 생존과 기능을 증진시키는 것으로 밝혀져 알츠하이머병의 치료제로 제시되고 있다(Hefti, 1994, *J Neurobiol.*, 25, 1418-1435). 하지만, 과도한 양의 활성산소에 의한 지질 과산화(lipid peroxidation), 8-하이드록시 디옥시구아노신(8-hydroxy deoxyguanosine), 단백질 카르보닐(protein carbonyls), 질화(nitration), 단백질의 산화적 교차결합(oxidative crosslinking of proteins) 등이 알츠하이머병에서 증가해 있다고 알려져 있다(Vitek *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 4766-4770; Smith *et al.*, 1995, *Trends Neurosci.*, 18, 172-176, Smith *et al.*, 1996, *Mol. Chem. Neuropathol.*, 28, 41-48, Smith *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*

S. A., 94, 9866-9868; Montine *et al.*, 1996, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55, 202-210).

아연은 알츠하이머병 환자의 뇌(amygdala, hippocampus, inferior parietal lobule, superior and middle temporal gyri)에서 증가해 있으며, 주로 아밀로이드 플라그의 중심과 주변에서 더 많이 관찰되었다(Lovell *et al.*, 1998, *J. Neurol. Sci.*, 158, 47-52). 따라서, 산화적 독성 및 아연독성에 의한 신경 세포괴사 방어 효과를 나타내는 본 발명에 따른 화합물들은 뉴로트로핀과 더불어 알츠하이머병의 치료제로 이용될 수 있다.

#### <146> <적용 예 2> 파킨슨병(Parkinson's disease)

<147> 파킨슨 병은 흑질에 존재하는 도파민 신경 세포의 괴사가 동반되어 진전, 근육경직, 운동 완서, 비정상적 자세, 운동 불능 등의 다양한 증상들을 나타내는 퇴행성 신경계 질환이다. 신경 세포괴사의 주요 원인으로 산화적 독성이 제시되고 있는데 지질파산화(lipid peroxidation), DNA 산화(DNA oxidation), 단백질 카보닐 및 나이트로타이로신(protein carbonyl, nitrotyrosine)의 증가가 흑질에서 발견된다. 또한, 파킨슨병의 동물 모델에서 세포고사의 증거가 보고되었으며 (Tatton and Kish, 1997, *Neuroscience*, 77, 1037-1048; He *et al.*, 2000, *Brain Research*, 858, 163-166; Turmel *et al.*, 2001, *Mov. Disord.*, 16, 185-189) 뉴로트로핀인 BDNF나 GDNF (Glial cell-derived neurotrophic factor)가 파킨슨병의 세포고사를 선택적으로 억제하여 신경세포를 보호한다고 보고되었으므로(Bradford *et al.*, 1999, *Adv. Nerurol.*, 80, 19-25; Levivier *et al.*, 1995, *J. Neurosci.*, 15, 7810-7820; Olson, 1996, *Nat. Med.*, 2, 400-401; Gash *et al.*, 1996, *Nature*, 380, 252-255) 본 발명에서 기술한 뉴로트로핀과 산화적 독성 억제제는 파킨슨병의 치료에 매우 효과적으로 이용될 수 있다.

<148> <적용 예 3> 루게릭 병(Amyotrophic lateral sclerosis)

<149> 근위축성 측상 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis)은 주로 척수신경의 하위 운동 뉴런(lower motor neuron)으로부터 시작하여 점차 상위 운동 뉴런(upper motor neuron)으로 진행되어 대뇌피질, 뇌간, 척수의 운동 신경세포의 손상을 동반하고, 근위축, 호흡근력 약화 및 섬유축성 연축이 특징적으로 나타나며, 증상이 처음 관찰된 지 2-5년내에 사망한다. 특히, 유전적 근위축성 측삭 경화증 환자에서 염색체 21번(chromosome 21)에 위치하는 슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical)을 제거해주는 SOD-1 유전자에서 변이가 관찰되어 산화적 독성이 나타나며 환자의 뇌에서 상화적 독성의 지표인 단백질 카보닐 군이 증가해 있다고 보고되었다(Bowling *et al.*, 1993, *J. Neurochem.*, 61, 2322-2325). 최근 뉴로트로핀의 일종인 BDNF를 루게릭을 치료하기 위한 임상실험에 적용한 결과, 치료효과를 관찰할 수 없었는데(Apfel *et al.*, 2001, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 39(4), 351-5), BDNF 자체에 의한 산화적 독성의 결과와도 관련이 있을 것으로 추측된다. 그러므로, 산화적 독성 억제제와 뉴로트로핀을 사용하면 루게릭병을 더욱 효과적으로 치료할 수 있다.

<150> <적용 예 4> 허혈성 뇌졸중(Hypoxic-ischemic injury)

<151> 뇌졸중은 뇌의 혈액 순환 장애(혈전증, 색전증, 협착증)에 의해 일정한 양으로 공급되는 포도당 및 산소가 부족함으로 인해 일어나는 질환으로서, 손상을 받은 뇌에 의한 신체기능 조절의 손실로 인해 마비증세, 언어 및 인지 기능의 장애가 발생한다. 뇌졸중이 일어나고 난 뒤 세포막의 탈극성(membrane depolarization)으로 인해 세포내로 칼슘이 유입되면 이것이 다시 미토

콘드리아로 유입되어 호흡체계(respiratory chain)가 손상되고 활성 산소의 생성이 증가하여 세포내에 활성 산소가 과량 쌓이게 된다. 생성된 활성 산소는 세포막 지질의 파괴, 유전자의 손상, 단백질 변성 등을 유도해 신경세포의 괴사가 일어나며, 이에 대해 항산화제는 허혈성 신경세포의 괴사를 억제하는 효과가 있다(Holtzman et al., 1996, *Ann. Neurol.*, 39(1), 114-122; Ferrer et al., 2001, *Acta neuropathol. (Berl.)*, 101(3), 229-38; Hall et al., 1990, *Stroke*, 21, 11183-11187). 또한, 이외에도 뇌졸중 후 허혈 부위(ischemic area)의 반음영 지역(penumbra zone)에서 DNA 래더(ladder)와 TUNEL 염색과 같은 세포 고사의 특징도 관찰되는 것으로 보아 세포의 고사와 괴사가 동시에 일어남을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 뉴로트로핀과 산화적 독성을 억제제가 뇌졸중을 효율적으로 예방, 치료할 수 있다.

<152> <적용예 5> 퇴행성 척추손상(Chronic spinal cord injury)

<153> 척추의 손상은 하반신 마비와 사지 마비를 일으키며 손상 부위로부터 먼 거리에 있는 부위까지 신경세포의 괴사가 관찰되지만, 이에 대한 치료제나 치료법이 개발되어 있지 않은 실정이다. 척추손상에는  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입, 세포막의 붕괴, 산화적 독성에 의한 지질의 과산화가 관찰된다고 보고되었으며(Brown and Hall, 1992, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 200, 1849-1859; Springer et al., 1997, *J. Neurochem.*, 68, 2469-2476; Juurink and Paterson, 1998, *J. Spinal cord Med.*, 21, 309-334), 최근에는 세포의 괴사가 2차 손상에 관여한다는 증거가 제시되고 있고, 세포 괴사에 관여하는 효소인 카스파제(caspase)에 대한 억제제가 신경세포의 괴사를 감소시킨다고 보고되었다 (Zhang

*et al.*, 1990, *J. Neurochem.*, 59, 733-739). 따라서, 뉴로트로핀의 신경보호 작용과, 산화적 독성 억제제가 가진 뉴로트로핀의 단점을 보완하는 역할을 통해 퇴행성 척추손상의 치료에 효과적으로 사용될 수 있다 (*Jin et al.*, 2002, *Exp. Neurol.*, 177(1), 265-75).

<154> <적용예 6> 헌팅تون병(Huntington's disease)

<155> 헌팅تون병은 선상 프로젝션 뉴런(striatal projection neuron)이 선택적으로 고사하는 퇴행성 뇌질환으로 신경 세포고사에 활성산소가 관여하며, 뉴로트로핀의 생성을 유도하거나 외부에서 뉴로트로핀을 투여함으로써 병의 진행을 억제할 수 있다고 알려져 있다. 최근에는 GDNF나 BDNF 같은 뉴로트로핀을 생성하도록 유전적으로 조작된 신경세포를 선상뉴런에 주입하였을 경우 헌팅تون병 동물모델의 신경세포 고사를 감소시킨다는 연구결과도 있다(*Perez-Navarro et al.*, 2000, *J. Neurochem.*, 75(5), 2190-9). 따라서, 뉴로트로핀을 산화적 독성 억제제와 함께 투여하면 헌팅تون병의 치료 및 예방에 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

<156> <적용예 7> 녹내장(Glaucoma) 및 망막퇴화(Renal detachment)

<157> 망막 퇴화의 주요 원인으로는 허혈에 의한 퇴화와 신경영양인자의 결핍에 의한 망막 신경세포의 퇴화가 있으며, 퇴화의 기전은 복합적으로 나타난다. 허혈에 의한 망막 신경 세포의 고사의 과정은 안압의 증가(녹내장, Glaucoma)에 의해 망막으로의 혈류가 막히거나 감소하며, 허혈 상태가 되고 자유 라디칼의 생성에 의하여 망막 신경세포는 고사하게 된다(*Ko*

*et al.*, 2000, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41(10), 2967-71). 시신경 절단에 의한 망막 퇴화 동물모델이 있는데 이는 뉴로트로핀의 결핍과 세포고사의 모델로 알려져 있다. 상기 모델은 망막 신경절 세포의 퇴화를 유도하는데, 퇴화과정은 천천히 일어나며 시신경 절단 후 14일 후에 약 80%이상의 신경절 세포가 퇴화되는 것으로 알려져 있으며, 시신경 절단으로 인한 신경세포의 퇴화는 뉴로트로핀의 결핍에 의하여 신경절 세포의 반응이 사라짐에 의하여 일어나는 것으로 보고되었다(Lewis *et al.*, 1999, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40(7), 1530-1544). 따라서, 이러한 시신경 세포의 고사를 방지하기 위해서는 뉴로트로핀과 산화적 독성 억제제를 복합적으로 처리하는 것이 치료에 매우 효과적일 것으로 기대된다.

### 【발명의 효과】

<158> 본 발명의 산화적 독성 억제제는 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사를 억제하고, 뉴로트로핀에 의한 세포고사의 억제를 차단하지 않아, 뉴로트로핀과 함께 처리할 경우 세포괴사 및 세포고사를 동시에 억제할 수 있어 허혈성 뇌졸증, 퇴행성 척추손상, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 루게릭병, 혼팅تون병, 신경병증, 녹내장, 및 망막박리 등의 신경 질환을 치료 또는 예방하는데 유용하게 사용될 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

산화적 독성 억제제를 투여하여 뉴로트로핀에 의해 유도되는 세포괴사를 억제하는 방법.

**【청구항 2】**

산화적 독성 억제제 및 뉴로트로핀을 함께 투여하여 세포괴사 및 세포고사를 억제하는 방법.

**【청구항 3】**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 뉴로트로핀은 NGF, BDNF, 뉴로트로핀-3 및 NT-4/5로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 4】**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 뉴로트로핀은 BDNF인 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 5】**

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 산화적 독성 억제제는 NADPH 옥시다제 저해제, 비타민 E 또는 그의 유도체 및 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 6】**

제 5항에 있어서, NADPH 옥시다제 저해제는 디페닐렌 이오도니움(DPI) 및 4-(2-아미노에틸)-벤젠설포닐 플로라이드(AEBSF)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 7】**

제 5항에 있어서, 비타민 E의 유도체는 트로록스인 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 8】**

제 5항에 있어서, 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체는  
BAS(5-benzylaminosalicylic acid), TBAS(5-(4-trifluoromethylbenzyl) aminosalicylic acid),  
NBAS(5-(4-nitrobenzyl) aminosalicylic acid), CBAS(5-(4-chlorobenzyl) aminosalicylic  
acid), MBAS(5-(4-methoxybenzyl) aminosalicylic acid), FBAS(5-(4-fluorobenxyl)  
aminosalicylic acid) 및  
2-hydroxy-TTBA(2-Hydroxy-5-(2,3,5,6-tetrafluoro-4-trifluoromethyl- benzylamino)-benzoic  
acid)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 9】**

제 2항에 있어서, 허혈성 뇌졸중, 퇴행성 척추손상, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 루게  
릭병, 신경병증, 현霆튼병, 녹내장 또는 망막박리의 치료 또는 예방에 이용하는 것을 특징으로

하는 방법.

【청구항 10】

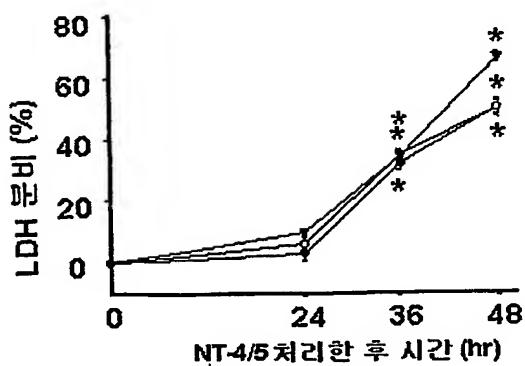
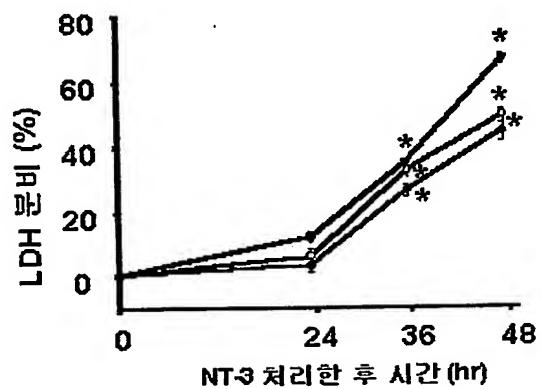
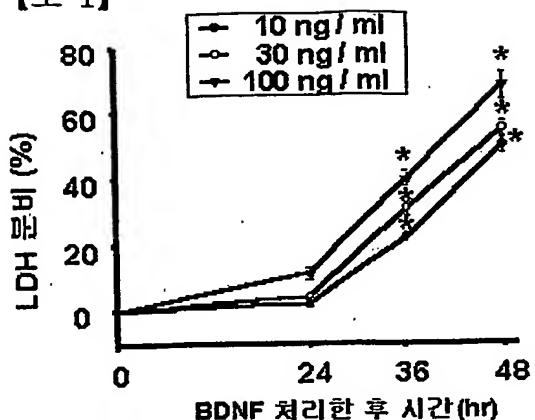
BAS, TBAS, NBAS, CBAS, MBAS, FBAS 및 2-hydroxy-TTBA로 구성된 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체로부터 선택된 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 뉴로트로핀에 의해 유도된 세포괴사 억제제.

【청구항 11】

BAS, TBAS, NBAS, CBAS, MBAS, FBAS 및 2-hydroxy-TTBA로 구성된 테트라플루오로벤질아미노살리실릭산 유도체로부터 선택된 하나 이상 및 뉴로트로핀을 유효성분으로 함유하는 세포괴사 및 세포고사 동시 억제제.

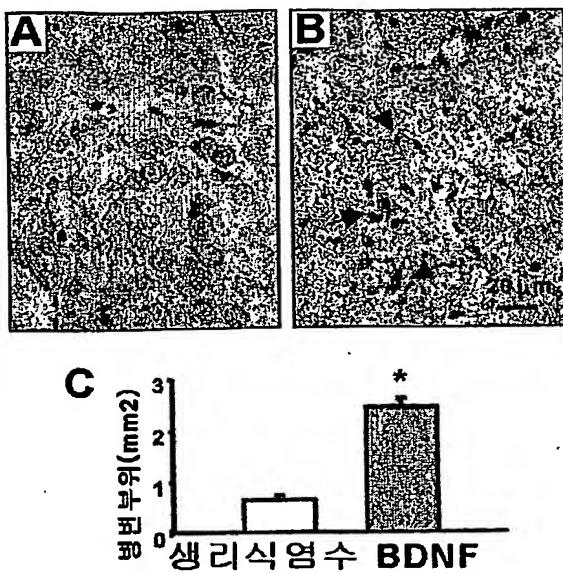
## 【도면】

【도 1】

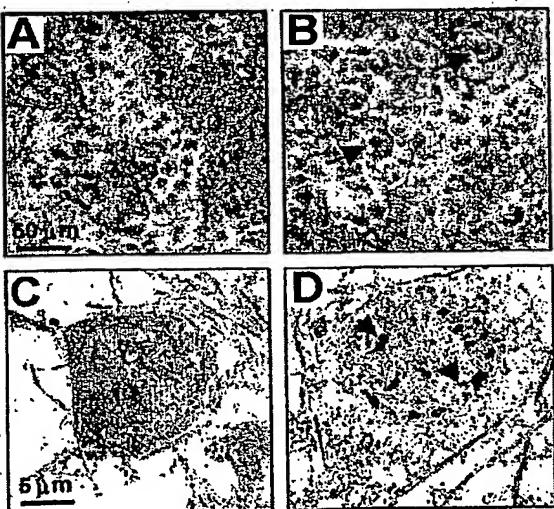


BEST AVAILABLE COPY

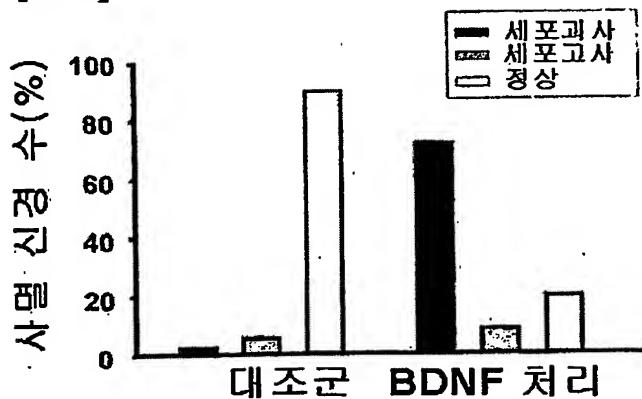
【도 2】



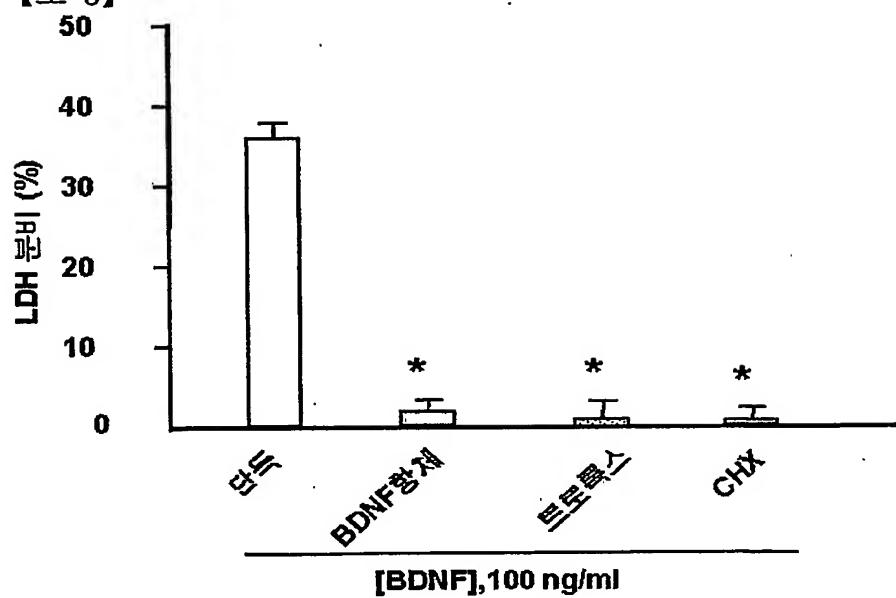
【도 3】



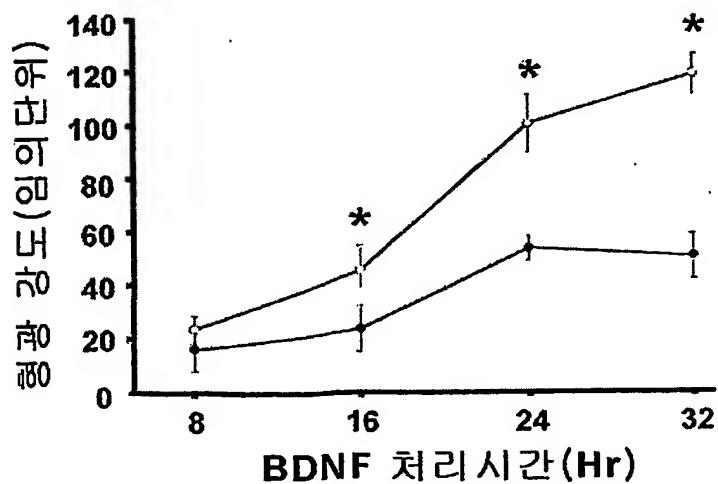
【도 4】



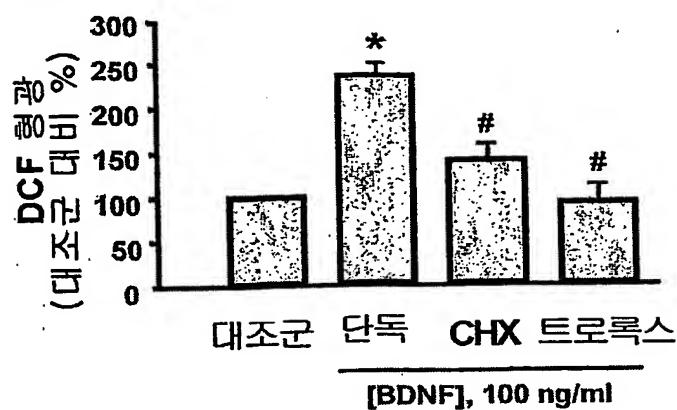
【도 5】



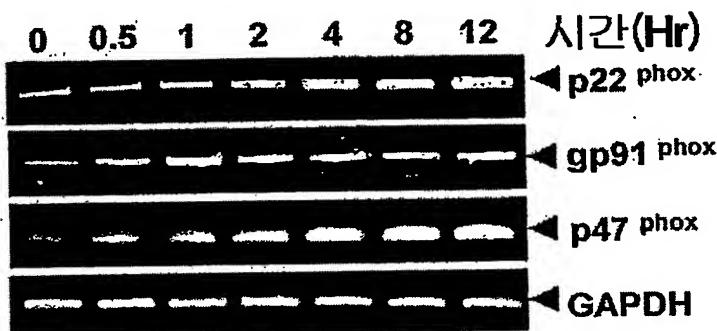
【도 6】



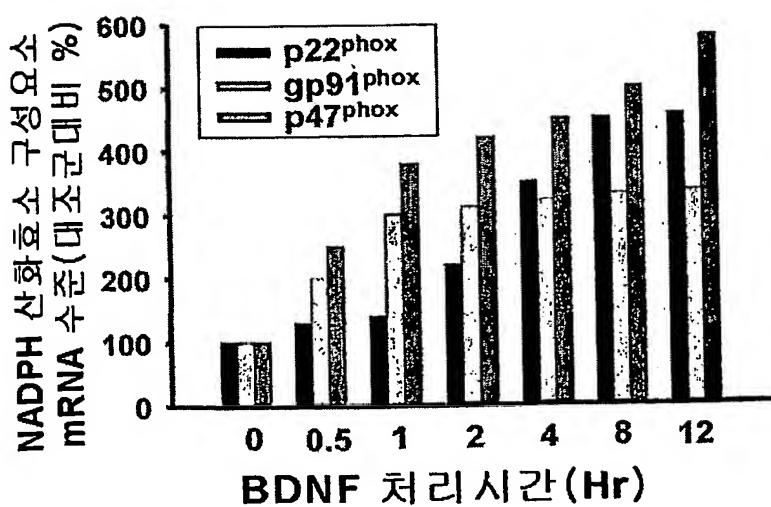
【도 7】



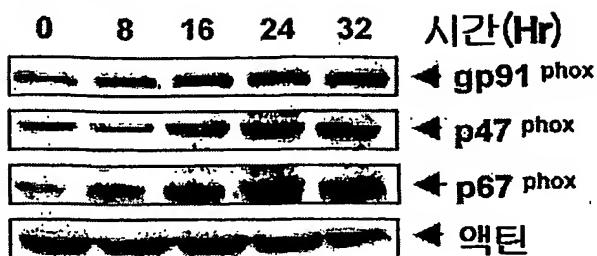
【도 8】



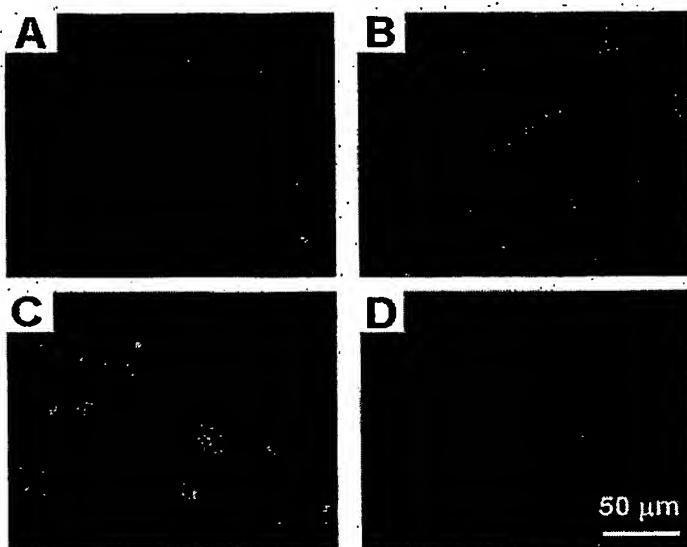
【도 9】



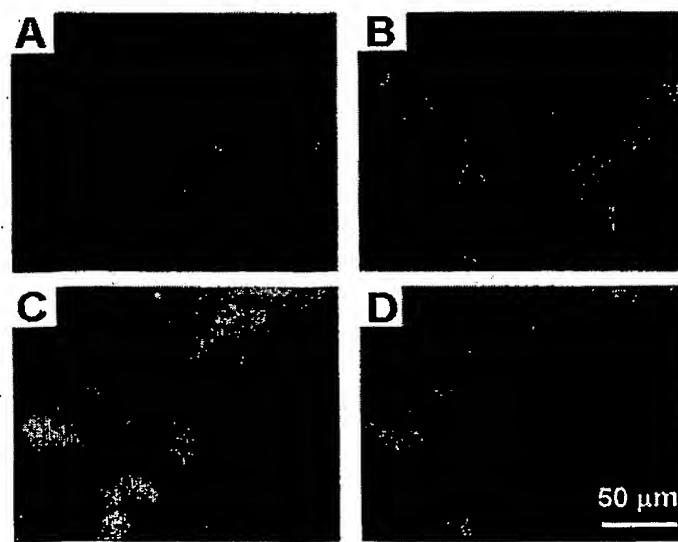
【도 10】



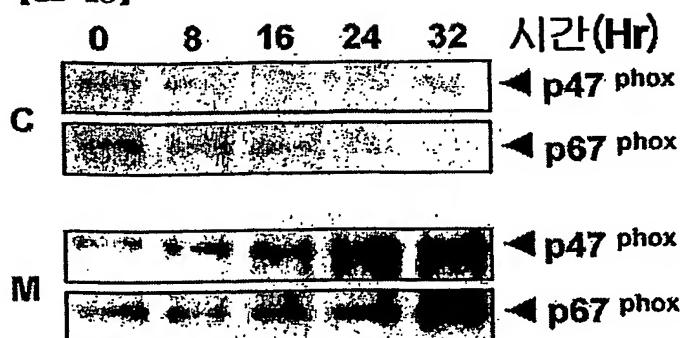
【도 11】



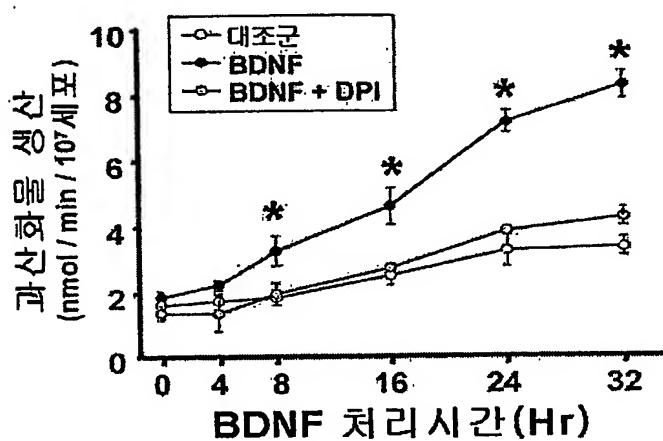
【도 12】



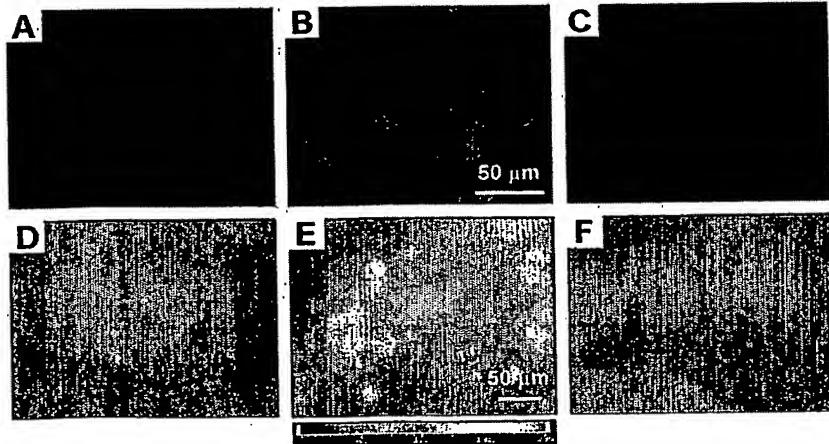
【도 13】

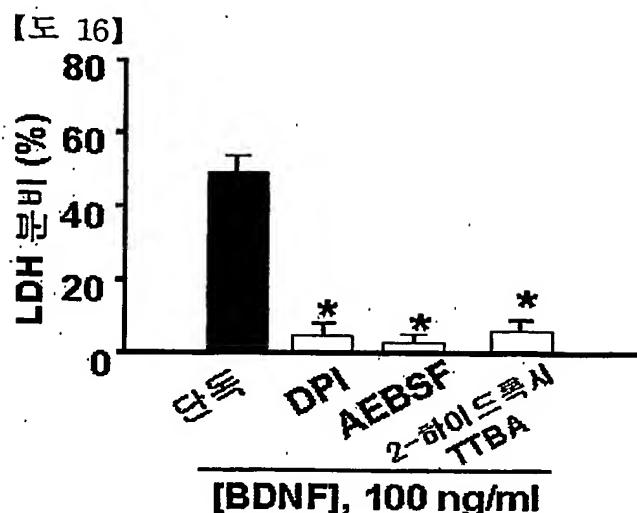


【도 14】

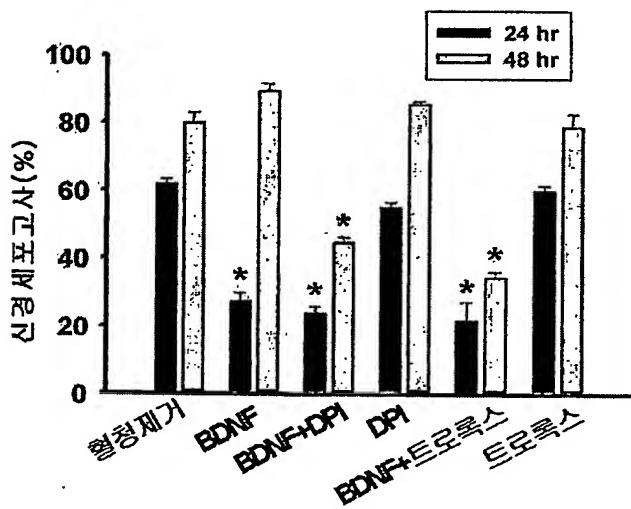


【도 15】





【도 17】



## 【서열목록】

<110> NEUROTECH CO.,LTD GWAG, Byoung Joo <120> Method for inhibition of necrosis induced by neurotrophin <130> 2p-07-13 <160> 8 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> p22-phox forward primer <400> 1 gaattccgat gggcagatc gagtgccca <210> 2 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> p22-phox reverse primer <400> 2 ggatccgtc acacgacactc atctgtcact 30 <210> 3 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> p47-phox forward prime <400> 3 cagccagcac tatgtgtaca <210> 4 <211>

21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> p47-phox reverse primer <400> 4 gaactcgtag  
atctcggta a 21 <210> 5 <211> 30 <212> DNA <213>  
Artificial Sequence <220> <223> gp91-phox forward primer <400> 5 gaattccgat ggggaactgg gctgtgaat  
30 <210> 6 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> gp91-phox reverse  
primer <400> 6 ggatcccggtt agaagtttc cttgttgaaa 30 <210> 7  
<211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> gapdh forward primer <400> 7  
tccatgacaa ctttggcatc gtgg 24 <210> 8 <211> 24 <212>  
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> gapdh reverse primer <400> 8 gttgctgttg aagtacagg aga  
24